



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/54, 9/12, A61K 38/45	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/29196 (43) Date de publication internationale: 14 août 1997 (14.08.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00193 (22) Date de dépôt international: 31 janvier 1997 (31.01.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/01603 9 février 1996 (09.02.96) FR 96/09709 1er août 1996 (01.08.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel-Voisin, F-92330 Sceaux (FR). BLANCHE, Francis [FR/FR]; 41, rue des Solitaires, F-92019 Paris (FR). COUDER, Michel [FR/FR]; 15, rue du Vert-Galant, F-94370 Sucy-en-Brie (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: VARIANTS OF THYMIDINE KINASE, RELATED NUCLEIC ACIDS SEQUENCES AND THEIR USE IN GENIC THERAPY (54) Titre: VARIANTS DE LA THYMIDINE KINASE, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CORRESPONDANTES ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE (57) Abstract <p>The present invention relates to a nucleic acid sequence characterized in that it is derived from the wild nucleic acid sequence coding for a thymidine kinase, said nucleic acid sequence having at least one mutation in the region corresponding to the ATP binding site and conveniently a second mutation in the N-terminal region and/or C-terminal region. It also relates to variants of the wild thymidine kinase and their uses in genic therapy.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention se rapporte à une séquence d'acides nucléiques caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence d'acides nucléiques sauvage codant pour une thymidine kinase, ladite séquence d'acides nucléiques possédant au moins une mutation dans la région correspondant au site de liaison à l'ATP et avantageusement une deuxième mutation dans la région N-terminale et/ou la région C-terminale. Elle concerne en outre des variants de la thymidine kinase sauvage et leurs utilisations en thérapie génique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

VARIANTS DE LA THYMIDINE KINASE, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CORRESPONDANTES ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

La présente invention concerne des séquences d'acides nucléiques codant pour des enzymes dérivées de l'enzyme thymidine kinase sauvage, TK, et possédant des fonctions améliorées en vue d'une utilisation thérapeutique. Elle concerne plus particulièrement des nouvelles enzymes possédant une spécificité de substrat et/ou une efficacité améliorées par rapport à l'enzyme thymidine kinase de type sauvage. Elle se rapporte également à des vecteurs contenant ces séquences d'acides nucléiques et à leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique.

La présente invention concerne plus particulièrement le domaine de la thérapie génique qui met en oeuvre des gènes suicides en vue d'induire la mort cellulaire de cellules spécifiques telles que des cellules infectées par un virus comme le virus de type VIH (virus d'immunodéficience humaine), CMV (cytomegalovirus) ou VCR (virus respiratoire syncytial). Ce type de traitement thérapeutique, consistant à faire exprimer au sein d'une cellule un gène suicide, est également appliqué pour le traitement des cancers et de certaines maladies cardiovasculaires.

Comme gène suicide, on utilise préférentiellement en thérapie génique des gènes dont le produit d'expression confère à la cellule, une sensibilité à un agent thérapeutique. Plus généralement, il s'agit de gènes codant pour des enzymes non mammifères et non toxiques qui, lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules de mammifères, transforment une prodrogue, initialement peu ou pas toxique, en un agent hautement toxique. Un tel mécanisme d'activation de prodrogues est avantageux à plusieurs titres: il permet d'optimiser l'indice thérapeutique en ajustant la concentration en prodrogue ou l'expression de l'enzyme, d'interrompre la toxicité en n'administrant plus la prodrogue et d'évaluer le taux de mortalité.

De nombreux gènes suicides sont décrits dans la littérature comme par exemple les gènes codant pour la cytosine désaminase, la purine nucléoside

phosphorylase ou une thymidine kinase comme par exemple les thymidines kinases du virus de la varicelle ou du virus de l'herpès simplex de type 1. Parmi ces gènes, le gène codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 est tout particulièrement intéressant sur le plan thérapeutique car, à la différence des autres

5 gènes suicides, il génère une enzyme, la thymidine kinase, capable d'éliminer spécifiquement les cellules en cours de division. Cette enzyme a une spécificité de substrat différente de l'enzyme cellulaire, et on a montré qu'elle était la cible d'analogues de guanosine tels que l'acyclovir ou le ganciclovir (Moolten 1986 Cancer Res. 46 p5276).

10 Dans le cas particulier du couple HSV1-TK / ganciclovir, le mécanisme d'action peut être schématisé comme suit: les cellules de mammifères, modifiées pour exprimer l'enzyme HSV1-TK, effectuent la première étape de phosphorylation du ganciclovir pour conduire au ganciclovir monophosphate. Cette étape serait limitante. Ultérieurement, des kinases cellulaires permettent la métabolisation de ce ganciclovir

15 monophosphate successivement en diphosphate puis triphosphate. Le ganciclovir triphosphate ainsi généré, produit alors des effets toxiques en s'incorporant à l'ADN et inhibe en partie l'ADN polymérase alpha cellulaire ce qui provoque l'arrêt de la synthèse d'ADN et donc conduit à la mort de la cellule (Moolten 1986 Cancer Res. 46 p5276 ; Mullen 1994 Pharmac. Ther. 63 p199).

20 Par ailleurs, un effet de toxicité propagée (effet "by stander") a été observé lors de l'utilisation de la TK. Cet effet se manifeste par la destruction non seulement des cellules ayant incorporé le gène TK mais également les cellules avoisinantes. Le mécanisme de ce processus peut s'expliquer de trois façons : i) la formation de vésicules apoptotiques qui contiennent du ganciclovir phosphorylé ou la thymidine

25 kinase, provenant des cellules mortes, puis la phagocytose de ces vésicules par les cellules voisines; ii) le passage de prodrogue métabolisée par la thymidine kinase, par un processus de coopération métabolique des cellules contenant le gène suicide vers les cellules ne le contenant pas et/ou iii) une réponse immunitaire liée à la régression de la tumeur (Marini et coll. 1995 Gene Therapy 2 p655).

Pour l'homme de l'art, l'utilisation du gène suicide codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès est très largement documentée. En particulier, les premières études in vivo sur des rats ayant un gliome montrent des régressions de tumeurs lorsque le gène HSV1-TK est exprimé et que des doses de 150 mg/kg de ganciclovir sont injectées [K. Culver et coll. 1992 Science 256 p1550]. Toutefois, ces doses sont hautement toxiques chez la souris [T. Osaki et coll. 1994 Cancer Research 54 p5258] et donc totalement proscrites en thérapie génique chez l'homme.

Un certain nombre d'essais thérapeutiques sont également en cours chez l'homme, dans lesquels le gène TK est délivré aux cellules au moyen de différents vecteurs tels que notamment des vecteurs rétroviraux ou adénoviraux. Dans les essais cliniques de thérapie génique chez l'homme, ce sont des doses beaucoup plus faibles qui doivent être administrées de l'ordre de 5 mg/kg et pour une durée du traitement courte (14 jours) (E. Oldfield et coll. 1995 Human Gene Therapy 6 p55). Pour des doses plus élevées ou des traitements plus prolongés dans le temps, on observe en effet des effets secondaires indésirables.

Il serait donc particulièrement avantageux de disposer d'un gène suicide apparenté au gène codant pour la thymidine kinase sauvage, capable de générer un variant de l'enzyme TK sauvage plus spécifique et/ou plus actif pour phosphoryler le ganciclovir. Avantageusement, un tel variant peut également être mis en oeuvre à une dose significativement réduite comparativement à la dose en gène suicide sauvage, et en outre permettre de réduire la dose de substrat qui lui est classiquement associée.

La présente invention a précisément pour objet de proposer une séquence d'acides nucléiques codant pour un enzyme de type thymidine kinase ayant un comportement activateur plus performant à l'égard du ganciclovir ou un analogue nucléoside.

La séquence du gène codant pour l'enzyme thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5949). Il en existe des variants naturels conduisant à des

protéines ayant une activité enzymatique comparable sur la thymidine, ou le ganciclovir (M. Michael et coll. 1995 Biochem. Biophys. Res. Commun 209 p966). De même, ont été décrits des dérivés obtenus par mutagenèse dirigée au niveau du site de liaison de l'enzyme avec le substrat. Toutefois, aucune caractérisation biochimique précise sur les enzymes pures n'a été réalisée et aucun test cellulaire utilisant ces mutants n'a été publié (Black et coll., 1993 Biochemistry 32 p11618). En outre, l'expression inductible d'un gène HSV1-TK, délété de ses 45 premiers codons, a été réalisée dans des cellules eucaryotes mais les doses en prodrome utilisées demeurent comparables à celles décrites dans tous les essais de la littérature (B. Salomon et coll. 1995 Mol. Cell. Biol. 15 p5322). En conséquence, aucun des variants décrits jusqu'ici ne présente une activité améliorée à l'égard ou vis à vis du ganciclovir.

La présente invention décrit la construction de nouveaux variants de thymidine kinase possédant des propriétés enzymatiques améliorées. La présente demande décrit également la construction de séquences d'acides nucléiques codant pour ces variants ainsi que des vecteurs contenant lesdites séquences et permettant leur administration in vivo et la production in vivo des mutants.

De manière inattendue, la Demanderesse a en effet préparé, isolé et caractérisé une série de séquences d'acides nucléiques particulières codant pour des variants de la thymidine kinase possédant le comportement activateur requis c'est à dire significativement améliorée comparativement à celui de la thymidine kinase sauvage. La demanderesse a en particulier mis en évidence que de nouveaux variants de la thymidine kinase ayant des propriétés enzymatiques améliorées pouvaient être obtenus notamment par modification de la région de la protéine responsable de la liaison avec l'ATP.

Ainsi un premier objet de l'invention réside dans une séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase caractérisée en ce qu'elle possède par rapport à la séquence sauvage au moins une mutation dans la région correspondant au

site de fixation de l'ATP associée à au moins une mutation dans la région N-terminale et/ou C-terminale.

Plus précisément, la présente invention a pour premier objet une séquence d'acides nucléiques caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence d'acides nucléiques
5 codant pour une thymidine kinase sauvage, ladite séquence d'acides nucléiques possédant au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP et au moins une mutation dans la région N-terminale et/ou C-terminale.

Au sens de la présente invention, le terme mutation, couvre toute substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus de la séquence d'acides
10 nucléiques considérée. Il est entendu que la séquence d'acides nucléiques revendiquée peut comprendre d'autres mutations, localisées ou non, dans les régions telles que définies ci-dessus.

Selon un mode préféré de l'invention, la séquence d'acides nucléiques dérive de la séquence codant pour la TK du virus herpès simplex de type I.
15 Préférentiellement, la mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP y est représentée par au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A).

En ce qui concerne la mutation présente dans la partie N-terminale de la TK, il peut s'agir d'une substitution de la guanine en position 16 par une adénine (G16A) ou
20 d'une double substitution des guanines en position 28 et 30 par des adénines (G28A et G30A).

Selon un mode préféré de l'invention, les séquences nucléiques revendiquées portent outre une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP au moins une mutation dans la partie C terminale et plus particulièrement localisée
25 entre les positions 990 et 1030. Selon un autre mode de l'invention, cette mutation présente dans la partie C-terminale est en outre associée à une mutation localisée dans la partie N-terminale de la TK telle que définie ci-dessus.

A titre représentatif d'une telle séquence on peut citer la séquence d'acides nucléiques comprenant au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A), au moins une double substitution des guanine en position 28 et 30 par des adénines (G28A et G30A) une double substitution des cystosines en position 591 et 892 par des thymines (C591T et C 892T) et une double substitution des guanines en position 1010 et 1011 par des adénines (G1010A et G1011A).

La séquence d'acides nucléiques codant pour un variant de la thymidine kinase est avantageusement choisie parmi :

(a) la séquence SEQ ID n° 3 ou une partie de celle ci portant la mutation (G180A) ou un de leur brin complémentaire,

(b) les séquences SEQ ID n° 6 et SEQ ID n° 7 ou une partie de celles-ci portant la mutation (G180A) et respectivement la mutation G16A et la double mutation (G28A ; G30A) ou un de leur brin complémentaire,

(c) la séquence SEQ ID n° 8 ou une partie de celle-ci portant la mutation (G180A) la double mutation (G28A ; G30A), et la quadruple mutation (C591T; C892T; G1010A; G1011A) ou un de leur brin complémentaire

(d) toute séquence hybridant avec les séquences (a), (b) et/ou (c) codant pour un variant de la thymidine kinase et conforme à la présente invention.

(e) les variants de (a), (b), (c) et(d) résultant de la dégénérescence du code génétique.

La séquence d'acides nucléiques selon l'invention peut être d'origine eucaryote bactérienne, virale, synthétique ou semi-synthétique.

D'une manière générale, les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent être préparées selon toute technique connue de l'homme du métier. A titre illustratif de ces techniques on peut notamment mentionner:

- la synthèse chimique, en utilisant les séquences présentées dans la demande et par exemple un synthétiseur d'acides nucléiques,

- le criblage de banques au moyen de sondes spécifiques, notamment telles que décrites dans la demande, ou encore

- 5 - les techniques mixtes incluant la modification chimique (élongation, délétion, substitution, etc) de séquences criblées à partir de banques.

Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention peuvent également être obtenues par mutagénèse(s), dirigée(s) ou non, d'une séquence d'acides nucléiques, naturelle ou déjà mutée, codant respectivement pour une thymidine kinase sauvage ou
10 un de ses variants. De nombreuses méthodes permettant de réaliser la mutagénèse dirigée ou au hasard sont connues de l'homme de l'art et on peut citer la mutagénèse dirigée par PCR ou par oligonucléotide, la mutagénèse au hasard in vitro par des agents chimiques comme par exemple l'hydroylamine ou in vivo dans des souches de E. coli mutatrices (Miller "A short course in bacterial genetics", Cold Spring Harbor
15 Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1992).

La présente invention s'étend ainsi à toute séquence d'acides nucléiques codant pour un variant d'une thymidine kinase sauvage et susceptible d'être obtenue à partir d'une séquence d'acides nucléiques telle que revendiquée en mettant en oeuvre l'une des techniques de modifications précédemment citées et plus préférentiellement
20 la mutagénèse, dirigée ou non.

Avantageusement, les produits des séquences revendiquées selon la présente invention s'avèrent plus performants que l'enzyme naturelle dont ils dérivent par modification(s) structurale(s). Exprimés dans des cellules cibles, ils présentent une activité enzymatique améliorée par rapport à l'enzyme naturelle vis à vis du
25 ganciclovir ou un analogue de nucléoside. Le comportement dit "plus activateur" ou "l'activité enzymatique améliorée" des variants selon l'invention s'apprécie comparativement à celui de l'enzyme sauvage, selon les protocoles décrits en détails dans les exemples ci-après.

Au sens de la présente invention on entend couvrir par analogue nucléoside des composés de type acyclovir, trifluorothymidine, 1-[2-deoxy, 2-fluoro, beta-D-arabino furanosyl]-5-iodouracil, ara-A, araT, 1-beta-D-arabinofuranosyl thymidine, 5-éthyl-2'-déoxyuridine, iodouridine, AZT, AIU, didéoxycytidine et AraC. A titre
5 d'analogue préféré dans le cadre de la présente invention, on peut plus particulièrement citer les BVDU, ganciclovir et penciclovir.

La présente invention a également pour objet des variants de thymidine kinase sauvages susceptibles d'être exprimés à partir d'une séquence d'acides nucléiques revendiquée.

10 Plus particulièrement, l'invention s'étend à tout variant d'une thymidine kinase caractérisé en ce qu'il comprend au moins une mutation au niveau de son site de fixation à l'ATP associée à au moins une mutation dans la région N-terminale et/ou C-terminale.

15 La localisation de ce site de fixation de l'ATP, au sein de la séquence peptidique de la thymidine kinase varie selon l'origine virale de celle-ci. C'est ainsi que, selon que l'on considère la thymidine kinase du virus de la varicelle, du virus de l'herpès simplex, de type 1 ou non, cette région est positionnée en des régions différentes. Toutefois, de manière générale, elle y figure sous le consensus
20 GXXXXGK(T/S) (SEQ ID N°1) avec X représentant un acide aminé quelconque et dans le cas particulier de la thymidine kinase de l'Herpès simplex virus de type 1, sous la séquence spécifique suivante GPHGMGKT (SEQ ID N°2).

En conséquence, la présente invention vise tout variant d'une thymidine kinase sauvage conforme à l'invention et comprenant au niveau de sa région peptidique suivante GXXXXGK(T/S) au moins une mutation.

25 Selon un mode préféré de la présente invention, la séquence possédant au moins une mutation est celle représentée par GPHGMGKT (SEQ ID N°2). Dans ce cas particulier, la mutation y est plus préférentiellement représentée par au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine.

A titre représentatif de ce type de mutant, on peut plus particulièrement citer le mutant 1537:E4 décrit dans les exemples ci-après.

En ce qui concerne plus particulièrement la mutation dans la région N-terminale. Elle est préférentiellement localisée dans les acides aminés numérotés de 1 à 20. Plus préférentiellement ladite mutation est localisée dans les acides aminés numérotés de 1 à 15. Encore plus préférentiellement ladite mutation est localisée dans les acides aminés numérotés de 1 à 10. Selon un mode de réalisation préféré ladite mutation est localisée dans les acides aminés numérotés de 5 à 10.

Selon un mode préféré, la présente invention vise un variant de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type I comprenant au moins une mutation représentée par une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine et par une substitution en position 10 d'une Alanine par une Thréonine.

A titre représentatif de ce type de mutant, on peut plus particulièrement citer le mutant 2-865:H12 décrit dans les exemples ci-après.

Selon un autre mode tout particulièrement préféré de la présente invention, il s'agit d'un variant de la thymidine kinase du virus herpès simplex de type I comprenant au moins une mutation représentée par une substitution en position 60 d'une Méthionine une Isoleucine et une substitution en position 6 d'une Glycine par une Sérine.

A titre représentatif de ce type de mutant, on peut plus particulièrement citer le mutant 2-3361:D3 décrit dans les exemples ci-après.

En ce qui concerne la mutation en region C-terminale, elle est de préférence localisée dans les acides aminés numérotés de 320 à 350. Plus préférentiellement ladite mutation est localisée dans les acides aminés numérotés de 325 à 345. Encore plus préférentiellement ladite mutation est localisée dans les acides aminés numérotés de 330 à 343. Selon un mode de réalisation préféré, ladite mutation est localisée dans les acides aminés numérotés de 335 à 340.

Selon un mode tout particulièrement préféré de la présente invention, il s'agit d'un variant de la thymidine kinase du virus herpès simplex de type I comprenant au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine, une substitution en position 10 d'une Alanine par une Thréonine et une substitution en position 337 d'une Arginine par une Glutamine.

A titre représentatif de ce type de mutant, on peut plus particulièrement citer le mutant 3-4216:H2 décrit dans les exemples ci-après.

Avantageusement, les variants selon l'invention présentent des performances améliorées au niveau de l'une ou plusieurs des caractéristiques enzymatiques suivantes:

- inhibition par le substrat: une inhibition par le ganciclovir à forte concentration est généralement observée avec l'enzyme sauvage; celle-ci est diminuée voire supprimée avec les variants selon l'invention.

- Vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou d'un autre analogue de nucléoside: les variants selon l'invention possèdent avantageusement une plus grande vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou d'un autre analogue;

- Vitesse de phosphorylation de la thymidine: celle ci est préférentiellement inchangée ou diminuée avec les variants de l'invention ce qui leur confère une plus grande sélectivité vis à vis du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside. Cette vitesse de phosphorylation de la thymidine sera définie dans ce qui suit à travers sa constante de spécificité K_{cat}/K_m . Il s'agit d'une constante de vitesse apparente de second ordre familière à l'homme de l'art. Elle permet de décrire les propriétés et les réactions de l'enzyme libre et du substrat libre. Pour des substrats en compétition, elle détermine la spécificité de l'enzyme vis à vis de ces substrats. (A. Fersht, Enzyme Structure and Mechanism 1985, W.H. Freeman, London).

Préférentiellement, les variants selon l'invention et en particulier le variant 1537:E4, manifestent avantageusement, les propriétés cinétiques suivantes:

- une diminution substantielle voir totale d'inhibition de l'activité de phosphorylation du ganciclovir contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est très nette à partir de 15 μ M;

5 - une augmentation au moins d'un facteur de 2 à 2,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20 μ M par rapport à l'enzyme sauvage,

- et un rapport Kcat/Km de la thymidine réduite au moins d'un facteur de 1 à 6 par rapport à celui de l'enzyme sauvage et de préférence d'au moins de 2.

10 Préférentiellement, les variants selon l'invention et plus particulièrement les variants 2-865:H12 et 2-3361:D3 présentent au moins l'une des performances cinétiques suivantes:

- une diminution significative de l'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à des concentrations élevées en ganciclovir ou en analogue de nucléoside,

15 - une vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside au moins triplée et/ou

- un rapport Kcat/Km de la thymidine soit inchangé comme pour le mutant 2-865 : H12 soit réduit d'un facteur au moins égal à 5 comme pour le mutant 2-3361:D3 par rapport à celui de l'enzyme sauvage.

20 Plus préférentiellement, le variant 3-4216:H2 selon l'invention présente au moins l'une des performances cinétiques suivantes:

- une absence d'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à des concentrations élevées en ganciclovir ou en analogue de nucléoside,

25 - une augmentation d'un facteur supérieur à 3,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20 μ M par rapport à l'enzyme sauvage et/ou

- un rapport K_{cat}/K_m de la thymidine diminué d'un facteur 4 par rapport à celui de l'enzyme sauvage.

De ces données, il ressort que le variant 3-4216:H2 manifeste un comportement particulièrement avantageux selon l'invention.

5 De telles qualités sont particulièrement avantageuses sur le plan thérapeutique puisqu'elles permettent d'envisager une réduction significative des doses d'utilisation en enzymes et/ou en analogue de nucléoside pour une efficacité au moins équivalente voire supérieure. L'innocuité est privilégiée sans pour autant porter préjudice à l'efficacité.

10 Au sens de l'invention, on entend également désigner par variant selon la présente invention toute enzyme obtenue par modification, à l'aide des techniques du génie génétique, de la séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase sauvage et possédant le comportement défini ci-dessus au regard du ganciclovir et/ou un analogue de nucléoside. (Par modification, on doit entendre toute mutation, 15 substitution, délétion, addition ou modification de nature génétique et/ou chimique).

Bien entendu, ces dérivés selon l'invention, capables d'induire via l'activation du ganciclovir ou un de ses analogues, la destruction desdites cellules peuvent avantageusement être exprimés in vivo directement à partir des séquences d'acides nucléiques revendiquées.

20 A cet effet, la présente invention concerne également toute cassette d'expression comprenant une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription. Le promoteur est avantageusement choisi parmi les promoteurs fonctionnels dans les cellules mammifères, de préférence humaines. Plus 25 préférentiellement, il s'agit d'un promoteur permettant l'expression d'une séquence d'acides nucléiques dans une cellule hyperproliférative (cancéreuse, resténose, etc). A cet égard, différents promoteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir par exemple du propre promoteur du gène TK de l'herpès simplex de type I. Il peut également s'agir

de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres gènes, ou même synthétiques). Il peut ainsi s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. On peut citer notamment les séquences promotrices

5 de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, alpha-actine, tubuline, DHFR etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs

10 de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoAI, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, alpha-actine du muscle lisse, etc), des promoteurs cellules spécifiques de type cellules en division comme les cellules cancéreuses ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des

15 hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, récepteur de glucocorticoïdes, etc) ou dits inductibles. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de

20 séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

La présente invention fournit maintenant de nouveaux agents thérapeutiques permettant d'interférer avec de nombreux dysfonctionnements cellulaires. Dans ce but, les acides nucléiques ou cassettes selon l'invention peuvent être injecté(e)s tel(le)s

25 quel(le)s au niveau du site à traiter, ou incubé(e)s directement avec les cellules à détruire ou traiter. Il a en effet été décrit que les séquences d'acides nucléiques nu(e)s pouvaient pénétrer dans les cellules sans vecteur particulier. Néanmoins, on préfère dans le cadre de la présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité

30 extra- et intracellulaires.

Dans un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de la présente invention, la séquence d'acides nucléiques ou la cassette est incorporée dans un vecteur. Le vecteur utilisé peut être d'origine chimique, biochimique ou virale.

5 Par vecteur chimique, on entend couvrir au sens de l'invention, tout agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression de séquences d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Ces vecteurs chimiques ou biochimiques, synthétiques ou naturels, représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transférer. Ces vecteurs
10 synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transférer et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques. A titre représentatif de ce type de techniques de transfection non virales, actuellement développées pour l'introduction d'une information génétique,
15 on peut ainsi mentionner celles impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

20 Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

25 La séquence d'acides nucléiques ou le vecteur utilisé dans la présente invention peut être formulé(e) en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, la séquence d'acides nucléiques ou le vecteur est utilisé(e) sous une forme injectable. Ils peuvent donc être mélangés à tout véhicule

pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de la séquence d'acides nucléiques dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses en séquences d'acides nucléiques utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

L'invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant.

Elle concerne également toute composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur tel que défini ci-avant.

Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant au moins un variant de la thymidine kinase tel que défini ci-avant.

En raison de leurs propriétés antiprolifératives, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont tout particulièrement adaptées pour le traitement des désordres hyperprolifératifs, tels que notamment les cancers et la resténose. La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour la destruction de cellules, notamment de cellules hyperprolifératives. Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose). Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers. A titre d'exemple, on peut citer les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers des os, de la

peau, du pancréas ou encore les cancers du rein et de la prostate, les cancers du larynx, les cancers tête et cou, les cancers ano-génitaux HPV positifs, les cancers du nasopharynx EBV positifs, etc.

Elle peut être utilisée in vitro ou ex vivo. Ex vivo, elle consiste essentiellement à incuber les cellules en présence d'une séquence d'acides nucléiques (ou d'un vecteur, ou cassette ou directement du dérivé). In vivo, elle consiste à administrer à l'organisme une quantité active d'un vecteur (ou d'une cassette) selon l'invention, de préférence directement au niveau du site à traiter (tumeur notamment), préalablement, simultanément et/ou après l'injection de la prodrogue considérée c'est à dire le ganciclovir ou un analogue nucléoside. A cet égard, l'invention a également pour objet une méthode de destruction de cellules hyperprolifératives comprenant la mise en contact desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec une séquence d'acides nucléiques ou un variant de la thymidine kinase tels que définis ci-avant.

En conséquence, la présente invention propose une enzyme TK mutée de telle sorte que la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue nucléoside mis en oeuvre, soit très significativement augmentée. Avantageusement, on peut ainsi, selon l'invention, utiliser dans des tests cellulaires et cliniques une séquence d'acides nucléiques TK mutée à des doses de prodrogue i) significativement plus faibles ; ii) ou susceptibles de provoquer un effet "by-stander" plus prononcé ; iii) ou bien ne conduisant pas à une toxicité cellulaire qui pourrait se produire lorsque la thymidine kinase sauvage est surexprimée.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures:

Figure 1 : Plasmide d'expression pXL2645

Figure 2 : Vitesses initiales de phosphorylation (activité spécifique en nmol/min/mg) en fonction de la concentration en thymidine (μ M) pour les enzymes HSV1-TK sauvage et mutantes 1537:E4, 2-865:H12, 2-3361:D3 et 3-4216:H2.

Figure 3. La courbe représente les vitesses de phosphorylation (activité spécifique en nmol/min/mg) en fonction de la concentration en ganciclovir en μM pour les enzymes HSV1-TK sauvage et mutantes (1537:E4, 2-865:H12, 2-3361:D3 et 3-4216:H2).

- 5 Figure 4 : Représentation schématique des plasmides pcDNA3-TK, pXL 3022 et pXL3037. Le tableau 1 ci-après résume les constantes cinétiques de ces enzymes vis-à-vis du ganciclovir et de la thymidine.

Thymidine kinase	Thymidine			Ganciclovir			Acyclovir	
	K_m (μ M)	V_{max} nmol/min/mg	K_{cat}/K_m s ⁻¹ / μ M ⁻¹	$S_{0.5}$ (μ M)	V_{max} obs nmol/min/mg	$S_{0.5}$ (μ M)	V_{max} obs	
Wild-type	0.12 ± 0.02	1020 ± 105	3540	4.13	400	51	220	
1537:E4	0.07 ± 0.01	305 ± 12	1815	6.4	550	66	250	
2-865:H12	0.12 ± 0.04	880 ± 77	3055	6.15	1080	62	280	
2-3361:D3	0.47 ± 0.12	718 ± 85	637	5.77	730	45	220	
3-4216:H2	0.71 ± 0.05	1486 ± 37	870	14.3	2100	123	590	
				K_m 24.3 \pm 3.8	V_{max} 2800 \pm 130	255 \pm 16	910 \pm 28	

TABLEAU 1

Le GCV ne présentant pas des constantes cinétiques classiques michaéliennes (sauf avec le mutant 3-4216:H2) les valeurs sont exprimées à l'aide de $S_{0.5}$ (i.e. concentration en substrat conduisant à la moitié de la vitesse maximale observée)

5 MATERIELS ET METHODES

Abréviations

ACV : acyclovir

GCV : ganciclovir

HSV1-TK : thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1.

10 Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans Escherichia coli sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature (Sambrook et coll. "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel et coll. "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).

Les plasmides de type pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories), les plasmides pBSK ou pBKS proviennent de Stratagen.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymerase-catalyzed Chain Reaction] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les recommandations du fabricant.

L'électroporation d'ADN plasmidique dans des cellules de *E. coli* peut-être réalisée à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur.

- La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham ou celui distribué par Applied Biosystems.

EXEMPLE 1 : CRIBLAGE BIOCHIMIQUE DE MUTANTS HSV1-TK.

1-1 Plasmide d'expression procaryote du gène HSV1-TK.

- Plusieurs systèmes d'expression du gène HSV1-TK chez *E. coli* sont décrits dans la littérature (Colbère et coll. 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 p3755 ; Kit et coll. 1981 Gene 16 p287 ; Waldman et coll. 1983 J. Biol. Chem. 258 p11571 ; Fetzer et coll. 1992 Pharm. Pharmacol. Lett. 2 p112 ; Brown et coll. 1995 Nature Structural Biology 2 p876). Celui qui est décrit ci-dessous permet une production très régulée et élevée de la protéine HSV1-TK sous sa forme native (non fusionnée, non tronquée).

- Le plasmide d'expression procaryote pXL2638 a été construit à partir du plasmide pHSV-106 (Gibco-BRL) et du vecteur d'expression pET11a (provenant de Novagen) de la façon suivante. Après avoir rendu les extrémités franches, l'insert BglII-NcoI de 1,5 kb provenant de pHSV-106 et contenant le gène HSV1-TK, dont la séquence est publiée par McKnight 1980 Nucl. Acids Res. 8 p5949, a été cloné au site SmaI du pBSK pour former le plasmide pBTK1. Un site NdeI a été introduit par mutagenèse dirigée à partir de la position -3 de la séquence codante du gène HSV1-TK. Pour cela un fragment de 500 bp contenant la partie 5' du gène a été amplifié par PCR en utilisant pBTK1 comme matrice et les oligonucléotides sens 5'(TTA TGA ATT CAT ATG GCT TCG TAC CCC GGC)3' SEQ ID N°4 et antisens 5'(TTA TTT CTA GAG GTC GAA GAT GAG GGT)3' SEQ ID N°5 comme amorces ; ce fragment a été cloné dans M13mp19 puis séquencé. Ce fragment digéré par EcoRI et SstI génère un insert de 460 pb qui a été co-cloné avec l'insert SstI-XbaI de 1 kb du pBTK1 contenant la partie 3' du gène HSV1-TK dans le plasmide pUC19 digéré par

EcoRI et XbaI ; ce plasmide pUCTK contient le gène HSV1-TK sous forme de cassette NdeI-BamHI qui a été clonée entre les sites NdeI et BamHI du pET11a pour créer le plasmide pXL2638. Ce plasmide permet d'exprimer le gène HSV1-TK sous le contrôle du promoteur du gène 10 du bactériophage T7 ; ce promoteur étant induit
5 lorsque l'ARN polymérase du bactériophage T7 est synthétisée comme par exemple dans la souche de E. coli BL21, lambdaDE3 (Studier et coll. 1990 Methods Enzymol. 185 p89).

1-2 Préparation des extraits acellulaires.

Les extraits acellulaires de souche de E. coli surproduisant la protéine HSV1-TK peuvent être préparés de diverses façons, parmi lesquelles on peut citer, la lyse au lysozyme en présence d'EDTA, l'utilisation d'appareils de broyage de type Menton-Golin, French Press, X-Press, ou l'action des ultrasons. Plus particulièrement, les extraits acellulaires de la souche de E. coli BL21, lambdaDE3 (Novagen Inc) pXL2638 ont été préparés de la façon suivante:

15 La souche E. coli BL21, lambdaDE3 pXL2638 est cultivée en milieu LB (Luria-Bertani) + ampicilline (50 mg/l) à 37 °C jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,7 ; la production de la protéine HSV1-TK est induite par l'ajout de 1 mM IPTG (isopropylthio-beta-D-galactoside) et s'effectue en poursuivant la croissance des cellules pendant 3 heures à 30 °C. Après centrifugation (5000 x g; 20 min), les cellules
20 obtenues à partir de 1 l de culture sont resuspendues dans 10 ml de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8, contenant 5 mM DTT, 4 mM MgCl₂, et 10 % glycérol (v/v), et soniquées durant 4 min à 4°C. Après centrifugation (50 000 x g; 1 h), le surnageant est injecté sur une colonne de Source 15Q (50 ml de gel; Pharmacia) équilibrée dans le tampon ci-dessus. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 400 mM
25 NaCl dans le tampon A. Les fractions contenant l'activité TK sont regroupées, amenées à une concentration finale de 1,1 M de sulfate d'ammonium et chromatographiées sur une colonne de Phenyl-Superose HR 10/10 (Pharmacia) éluee avec un gradient linéaire décroissant de 1,1 à 0 M de sulfate d'ammonium. Les fractions contenant l'activité TK sont regroupées. Après cette étape, la préparation

présente une seule bande visible en SDS-PAGE, après révélation au Bleu de Coomassie, et cette bande migre avec un poids moléculaire apparent de 41 000 environ.

1-3 Dosage de l'activité TK.

- 5 On peut détecter l'activité ATP-dépendante de phosphorylation de nucléosides en procédant par exemple de la façon suivante:

un extrait enzymatique contenant environ 0.1 unité de TK est incubé durant 15 min à 37°C dans 100 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 1 mg/ml BSA (albumine bovine sérique), 5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 12 mM KCl, 2 mM DTT, 600
10 µM EDTA et 100 µM [8-3H]-GCV (40 nCi/nmol) La réaction est arrêtée par l'ajout de 10 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 1mM thymidine non radioactive. Les espèces phosphorylées sont fixées sur une colonne de DEAE-Sephadex (400 µl de gel), puis, après lavage de la colonne, ces espèces sont éluées par 2 ml de 1 M HCl. La radioactivité dans l'échantillon est ensuite comptée par
15 scintillation liquide.

Le dosage de l'activité TK en utilisant la thymidine comme substrat est effectué de la même façon en mettant en jeu 0,002 unité de TK et 1 µM (méthyl-¹⁴C) thymidine (56nCi/nmole).

- 20 L'unité d'activité TK est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour phosphoryler 1 nmol de substrat par min dans les conditions ci-dessus.

Pour le calcul des constantes cinétiques, la quantité de TK introduite dans la réaction enzymatique est ajustée de façon à transformer au maximum 5 % du substrat introduit au départ, et l'activité spécifique de ce substrat est augmentée en conséquence. Les courbes de Michaelis sont ajustées aux points expérimentaux à l'aide du logiciel
25 Enzfitter (Sigma).

Puisque le GCV ne présente pas des constantes cinétiques classiques michaeliennes (sauf avec le mutant 3-4216:H2) les valeurs sont exprimées à l'aide de S0.5 (i.e. concentration en substrat conduisant à la moitié de la vitesse maximale observée)

1-4 Plasmide pXL2645 permettant un criblage biochimique.

Les systèmes d'expression hétérologue chez *E. coli* sont nombreux et bien connus de l'homme du métier. L'expression du gène HSV1-TK s'est avérée être la meilleure pour le criblage biochimique lorsque le gène est exprimé à l'aide du promoteur tryptophane pTryp à un nombre de copies élevé sur le plasmide pXL2645. L'insert NdeI-XbaI de 1,4 kb du pUCTK est co-cloné avec les inserts NdeI-EcoRI de 120 bp et EcoRI-XbaI de 3,1 kb du pXL694 (Jung et coll. 1988 Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 139 p129) pour générer le plasmide pXL2619. Les inserts suivant du pXL2619 : EcoRI-XbaI de 1,5 kb (contenant le gène HSV1-TK et pTryp : la région promoteur/opérateur de l'opéron tryptophane de *E. coli* suivie du RBS (site de fixation des ribosomes) du gène *cII* de lambda) et XbaI-BamHI de 530 bp contenant la région terminateur *T_{rrnB}* de l'opéron ribosomal de *E. coli* sont co-clonés dans le vecteur pBSK+ pour créer le plasmide pXL2645.

1-5 Mutagenèse du plasmide.

De nombreuses méthodes permettant de réaliser la mutagenèse dirigée ou au hasard sur plasmide sont connues de l'homme de l'art et on peut citer la mutagenèse dirigée par PCR ou par oligonucléotide en suivant les recommandations du fournisseur Amersham, la mutagenèse au hasard in vitro par des agents chimiques ou in vivo dans des souches de *E. coli* mutatrices (Miller "A short course in bacterial genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1992). Le plasmide pXL2645 a été mutagené à l'hydroxylamine selon un protocole déjà décrit et qui conduit à des transitions GC en AT au hasard sur le plasmide (Humphreys et coll. 1976 Mol. Gen. Genet. 145 p101). Cinq µg d'ADN plasmidique, dissous dans un tampon phosphate 0,2 M pH6 et contenant 0,4 M d'hydroxylamine, sont incubés à 80°C ou 86 °C pendant 30 min puis refroidis à température ambiante pendant 20 min, la solution est ensuite dialysée puis précipitée. L'ADN est alors redissous dans 50 µl d'eau. Si l'ADN plasmidique est pCH110 (provenant de Pharmacia) et portant le gène *lacZ* des mutants *lacZ⁻* sont obtenus à une fréquence de 2,4% (resp. 7,6%) lorsque le plasmide est chauffé à 80°C (resp. 86°C) en présence d'hydroxylamine.

1-6 Criblage de mutants présentant une TK modifiée.

Le plasmide pXL2645 mutagénisé à l'hydroxylamine à 80 °C est introduit par électroporation dans la souche de *E. coli tk⁻* ME8025 (provenant du National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, Ken, Japon). Les électroporants sont ensemencés
5 individuellement dans les puits de plaque de microtitration contenant 100 µl de milieu minimum M9 supplémenté avec 0,4 % de casaminoacides et 50 mg/l d'ampicilline. Les cultures sont incubées à 37 °C sous agitation pendant 17 heures. Quinze µl de la culture diluée au 1/25ième dans le tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 sont incubés pendant 20 min à 37°C dans un volume de 250 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8
10 contenant 2 mg/ml lysozyme de blanc d'oeuf, 5 mM ATP, 4 mM MgCl₂, 12 mM KCl, 2 mM DTT, 600 µM EDTA, 16 µM [8-³H]-GCV (60 nCi/nmol) et 1 µM [*methyl* -¹⁴C]-thymidine (56 nCi/nmol). La réaction est arrêtée par l'ajout de 25 µl de tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.8 contenant 1mM thymidine non radioactive. Les espèces phosphorylées sont fixées sur une colonne de DEAE-Sephadex (400 µl de gel), puis,
15 après lavage de la colonne, ces espèces sont éluées par 2 ml de 1 M HCl. La radioactivité (³H et ¹⁴C) dans l'échantillon est ensuite comptée par scintillation liquide en utilisant un programme de double marquage, et le ratio ³H/¹⁴C est calculé pour chaque échantillon.

Pour chaque plaque de microtitration de 96 puits, sont calculés la moyenne des
20 ratios ³H/¹⁴C de l'ensemble des clones (M) et l'écart-type (σ) de la distribution des ratios ³H/¹⁴C. De plus la quantité de protéines présente dans chacun des puits de la plaque 96 puits est mesurée à l'aide du réactif de Bradford (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce) à partir d'une fraction aliquote de la dilution au 1/25ième préparée ci-dessus. Tout clone présentant une teneur en protéines inférieure au quart
25 de la moyenne des clones de la boîte est éliminé définitivement.

Le ratio ³H/¹⁴C obtenu pour chaque clone d'une boîte 96 puits est comparé à la moyenne M. Les clones présentant un ratio supérieur à la somme M+3σ tout en présentant une activité de phosphorylation de la thymidine supérieure à M'/2, M' étant

la moyenne des activités de phosphorylation de la thymidine, sont retenus pour confirmation et étude.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus après criblage de 4129 clones provenant de la mutagenèse à l'hydroxylamine du pXL2645 à 80°C. Dans ce criblage, pour l'enzyme sauvage, l'activité TK est rapportée à 100% et le rapport GCV/Thy est de 1.

A l'issue de cette étude, il est mis en évidence un mutant dit 1537:E4 manifestant un comportement plus activateur vis à vis du ganciclovir.

Activité TK	%<TK<%	Nombre	Noms des Mutants	Fréquence %
Elevée	233 <TK<320	2	3841:D2 3841:F3	0,05
Faible	5<TK<10	17		0,4
Nulle	TK<5	99		2,4
Nulle sur le GCV mais inchangée sur la thymidine		1	2881:C8	0,02
Elevée sur le GCV mais inchangée sur la thymidine	GCV/Thy : 1,76 (σ : 0,11) 1,70 (σ : 0,19)	2	1537:E4 1921H:12	0,05

10

TABLEAU 2

EXEMPLE 2 : STRUCTURE PRIMAIRE ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DU MUTANT 1537:E4.

2-1 Séquence du gène HSV1-TK du mutant 1537:E4.

Le gène HSV-TK exprimé à partir du mutant 1537:E4 a été séquencé sur les deux brins et une seule mutation G180A a été observée. Cette mutation correspond à une substitution Met60Ile. Il est à noter que ce résidu est situé dans la région consensus du site

15

de fixation de l'ATP. Un travail comparable a été réalisé avec le mutant 1921:H12 et la même substitution (Met60Ile) a été observée.

2-2 Clonage du gène HSV1-TK du mutant 1537:E4 dans un vecteur procaryote d'expression élevée.

- 5 L'insert NdeI-BamHI de 1,4 kb codant pour le gène HSV1-TK du mutant 1537:E4 a été cloné dans le vecteur d'expression pET11a pour générer le pET:E4. C'est à partir de ce plasmide pET:E4 que l'enzyme HSV1-TK du mutant 1537:E4 a été produite chez E. coli BL21, lambdaDE3 dans les conditions décrites en 1-2.

2-3 Données biochimiques.

- 10 Les constantes cinétiques pour la TK mutante 1537:E4 et la TK sauvage prise en référence sont obtenues dans les conditions de dosage enzymatiques décrites au paragraphe 1-3.

- 15 Les 2 TK (sauvage et mutant 1537:E4) ne présentent pas un comportement Michaélien avec le Ganciclovir et l'Acyclovir (inhibition à forte concentration). Ceci interdit donc le calcul d'une valeur de K_m avec ces 2 substrats. Seule peut être donnée la concentration $S_{0,5}$ correspondant à concentration en substrat donnant une vitesse initiale égale à la moitié de la vitesse maximale observée. V_{max} et $V_{max\ obs}$ y sont exprimées en nmole/min/mg de protéine.

- 20 La courbe de la figure 2 montre les vitesses initiales de phosphorylation en fonction de la concentration de GCV pour les deux enzymes 1537:E4 et sauvage. Elle fait apparaître en particulier l'absence presque totale d'inhibition de l'activité de phosphorylation du GCV par la TK mutante 1537:E4, contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est très nette à partir de 15 μM . Cette courbe montre de plus une augmentation d'un facteur 2 à 2,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir
- 25 de 15-20 μM avec l'enzyme mutante 1537:E4 par rapport à l'enzyme sauvage. L'enzyme mutante 1537:E4 y présente un rapport K_{cat}/K_m de la thymidine réduit d'un facteur 2 par rapport à l'enzyme sauvage.

EXEMPLE 3 : OBTENTION, STRUCTURE PRIMAIRE ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES MUTANTS 2-865:H12 ET 2-3361:D3.

3.1 Obtention des mutants 2-865:H12 ET 2-3361:D3.

- 5 Le plasmide pXL2838, issu du mutant 1537:E4 porte, sous le contrôle du promoteur pTryp, le gène HSV1-TK dont la protéine TK est différente de la protéine sauvage par la mutation M60I. Ce plasmide est mutagénisé à l'hydroxylamine à 86°C puis introduit par électroporation dans la souche *E. coli tk⁻* ME8025. Un total de 4992 électroporants sont analysés pour leur capacité à phosphoryler le ganciclovir et
- 10 la thymidine comme cela est décrit dans l'exemple 1-6. Les résultats de ce criblage sont résumés dans le tableau 3 où l'activité TK est rapportée à 100% et le rapport GCV/Thy est de 1 pour l'enzyme sauvage. Deux mutants 2-865:H12 et 2-3361:D3 présentent un comportement plus activateur vis à vis du ganciclovir.

Activité TK	%<TK<%	Nombre	Noms des Mutants	Fréquence %
Nulle	TK<5	227		4,5
Faible	5<TK<10	55		1,1
Elevée sur le GCV mais inchangée sur la thymidine	GCV/Thy : 4,95 +/- 0,66 3,99 +/- 0,53	2	2-865:H12 2-3361:D3	0,04

15

TABLEAU 3

3-2 Séquence du gène HSV1-TK des mutants 2-865:H12 et 2-3361:D3.

- Le gène HSV1-TK exprimé à partir des mutants 2-865:H12 et 2-3361:D3 a été séquencé sur les deux brins et les mutations suivantes ont été observées. Avec le mutant 2-865:H12, les mutations sont G28A, G30A et G180A ce qui correspond aux
- 20 substitutions Ala10Thr et Met60Ile. Alors qu'avec le mutant 2-3361:D3 les mutations

sont G16A, G180A, C306T et C308T ce qui correspond aux substitutions Gly6Ser, Met60Ile et Thr103Ile.

3-3 Importance de la mutation localisée dans la N-terminale de la TK.

Les enzymes des mutants 2-865:H12 et 2-3361:D3 portent toutes deux une mutation dans la partie N-terminale de la thymidine kinase position 10 ou 6. Puisque l'enzyme correspondant au mutant 2-3361:D3 comporte aussi une mutation en position 103, des plasmides comportant les mutations en position 6 et 60 (pXL2964) ou en position 60 et 103 (pXL2963) ou en position 103 (pXL2965) ou en position 6 seulement (pXL2966) ont été construits de la façon suivante. L'insert SnaBI-BspEI de 400 bp du plasmide pXL2840 (plasmide extrait du mutant 2-3361:D3) a été cloné soit dans le plasmide pXL2645 digéré par SnaBI-BspEI pour générer pXL2965, ou soit dans le plasmide pXL2838 digéré par SnaBI-BspEI pour générer pXL2963. Le plasmide pXL2964 correspond à la ligature de l'insert MluI-XmnI de 2,9 kb du pXL2838 avec le fragment XmnI-MluI de 2,1 kb du pXL2840. Le plasmide pXL2966 correspond à la ligature de l'insert MluI-XmnI de 2,9 kb du pXL2645 avec le fragment XmnI-MluI de 2,1 kb du pXL2840. Ces plasmides ont été transformés dans la souche de *E. coli* ME8025 et l'activité thymidine kinase sur la thymidine et le ganciclovir est déterminée comme dans l'exemple 1-6, les rapports GCV/Thy figurent dans le tableau 4.

Plasmide (Mutant)	Mutation de l'enzyme TK	GCV/Thy
pXL2645	TK sauvage	1,00 +/- 0,08
pXL2838 (1537:E4)	M60I	1,60 +/- 0,17
pXL2840 (2-3361:D3)	G6S, M60I, T103I	3,10 +/- 0,26
pXL2963	M60I, T103I	1,60 +/- 0,18
pXL2964	G6S, M60I	2,80 +/- 0,40
pXL2965	T103I	1,00 +/- 0,18
pXL2966	G6S	1,40 +/- 0,20

Seul le rapport GCV/Thy obtenu avec le plasmide pXL2964 est comparable à celui obtenu avec le plasmide pXL2840. Et l'ensemble des résultats montrent que ce n'est pas la mutation en position 103 mais la mutation en position 6 qui conduit à une amélioration de l'activité TK sur le GCV du mutant 2-3361:D3 par rapport au mutant 1537:E4. D'autre part la mutation en position 6 seule conduit à une amélioration de l'activité TK. L'effet de cette mutation est donc additif à l'effet de la mutation en position 60 pour améliorer l'activité TK sur le GCV. De plus l'amélioration obtenue en combinant ces deux mutations Gly6Ser et Met60Ile peut aussi être obtenue en combinant avec la mutation Met60Ile une autre mutation située dans la partie N-terminale de la thymidine kinase par exemple la mutation Ala 10Thr.

3-4 Clonage du gène HSV1-TK des mutants 2-865:H12 et 2-3361:D3 dans un vecteur procaryote d'expression élevée.

L'insert NdeI-BamHI codant pour le gène HSV1-TK provenant du mutant 2-865:H12 (respectivement 2-3361:D3) a été cloné dans le vecteur d'expression pET11a pour former le plasmide pXL2843 (respectivement pXL2841). Ces plasmides ont été transformés dans *E. coli* BL21met-lambdaDE3 afin de produire les enzymes de ces deux mutants.

3-5 Données biochimiques.

Les enzymes TK issues des cultures *E. coli* BL21met-lambdaDE3, pXL2843 et *E. coli* BL21met-lambdaDE3, pXL2841 ont été purifiées jusqu'à homogénéité. Les constantes cinétiques pour la TK des mutants 2-865:H12 et 2-3361:D3 ont été déterminées et comparées à celles de la TK sauvage et du mutant 1537:E4. L'ensemble des valeurs est rapporté sur la figure 3. La courbe de la figure 3 montre les vitesses de phosphorylation en fonction de la concentration en GCV pour les quatre enzymes. Elle fait apparaître une levée partielle de l'inhibition par le GCV des TK mutantes 1537:E4 2-865:H12 et 2-3361:D3 contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est nette au delà de 30 μ M. Cette courbe montre aussi une augmentation de la vitesse de phosphorylation du GCV d'un facteur 1,6 à 2,5 à 16

5 μM de GCV et de 4,3 à 4,9 à 100 μM de GCV par rapport à l'enzyme sauvage. Le tableau 1 de la figure 3 montre que l'enzyme du mutant 2-865:H12 possède un rapport $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ de la thymidine inchangé par rapport à celui de l'enzyme sauvage, et que celle du mutant 2-3361:D3 manifeste un rapport $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ réduit d'un facteur supérieur ou égal à 5 par rapport à celui de l'enzyme sauvage.

EXEMPLE 4 : OBTENTION, STRUCTURE PRIMAIRE DU MUTANT ET CARACTERISTION BIOCHIMIQUE DU MUTANT 3-4216:H2

4.1 Obtention du mutant 3-4216:H2.

10 Le plasmide pXL2842, issu du mutant 2-865:H12 porte, sous le contrôle du promoteur pTryp, le gène HSV1-TK dont la protéine TK est différente de la protéine sauvage par les mutations Ala10Thr et Met60Ile. Ce plasmide est mutagénéisé à l'hydroxylamine à 86°C puis introduit par électroporation dans la souche *E. coli tk*-ME8025. Un total de 3900 électroporants sont analysés pour leur capacité à phosphoryler le ganciclovir et la thymidine comme cela est décrit dans l'exemple 1-6.

15 Les résultats de ce criblage sont résumés dans le tableau 5 où l'activité TK est rapportée à 100% et le rapport GCV/Thy est de 1 pour l'enzyme sauvage. Un mutant 3-4216:H2 présente un comportement plus activateur vis à vis du ganciclovir.

Activité TK	%<TK<%	nombre	MUTANTS Noms	Fréquence %
Nulle	TK<5	121		3,2
Faible	5<TK<10	19		0,5
Nulle sur le GCV mais inchangée sur la thymidine		1	3-2293:C4	0,025
Elevée sur le GCV mais inchangée sur la thymidine	GCV/Thy : 7,84+/- 1,09	1	3-4216:H2	0,025

TABLEAU 5

20

4.2 Séquence du gène HSV1-TK du mutant 3-4216:H2.

Le gène HSV1-TK exprimé à partir du mutant 3-4216:H2 a été séquencé sur les deux brins et les mutations suivantes ont été observées (G28A, G30A, G180A, C591T, C892T, G1010A, et G1011A). Ces mutations correspondent aux substitutions Ala10Thr, Met60Ile et Arg337Gln.

5 **4-3 Clonage du gène HSV1-TK du mutant 3-4216:H2 dans un vecteur procaryote d'expression élevée.**

10 L'insert NdeI-BamHI codant pour le gène HSV1-TK provenant du mutant 3-4216:H2 a été cloné dans le vecteur d'expression pET11a pour former le plasmide pXL3129. Ce plasmide a été transformé dans E. coli BL21met-lambdaDE3 afin de produire l'enzyme de ce mutant.

15 **4-4 Données biochimiques.**

15 L'enzyme TK issue de la culture E. coli BL21met-lambdaDE3, pXL3129 a été purifiée jusqu'à homogénéité. Les constantes cinétiques pour la TK du mutant 3-4216:H2 ont été déterminées et comparées à celles de la TK sauvage et des mutants 1537:E4, 2-865:H12 et 2-3361:D3. L'ensemble des valeurs est rapporté sur la figure 3 et le tableau 1. L'enzyme du mutant 3-4216:H2 est remarquable par la levée totale de l'inhibition par le substrat GCV et par l'augmentation de la vitesse de phosphorylation du GCV. La vitesse initiale de phosphorylation du GCV avec ce mutant est multipliée par un facteur 7, par rapport à l'enzyme sauvage, et un facteur 20 2,8 par rapport au mutant 2-865:H12. De plus, le mutant 3-4216:H2 possède une activité catalytique de phosphorylation de la thymidine plus faible que l'enzyme sauvage et les autres mutants 1537:E4, 2-865:H12 et 2-3361:D3, comme l'indiquent les valeurs Kcat/Km sur le tableau 1.

25 **EXEMPLE 5 - CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION DES VARIANTS DE TK**

Cet exemple décrit la construction de vecteurs utilisables pour le transfert des séquences d'acides nucléiques de l'invention in vitro ou in vivo.

5.1 - Construction de vecteurs plasmidiques

Pour ce faire on peut mettre en oeuvre des vecteurs commerciaux tels que les vecteurs pZeoSV, pSV2 pcDNA3...

5 - Le vecteur pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Ce vecteur est un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les variants TK ont été insérés dans ce vecteur aux sites HpaI-EcoRV. Ils sont ainsi placés sous le contrôle du promoteur de l'enhancer du virus SV40.

10 - Le vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Il s'agit également d'un vecteur d'expression eucaryote. Les séquences d'acides nucléiques codant pour les variants TK de l'invention sont ainsi placées, dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur précoce du CMV. En ce qui concerne les gènes codant pour la HSV1-TK sauvage et contrôle du promoteur précoce du CMV. Toutes les constructions décrites dans l'exemple ont été introduites dans ce vecteur entre les sites Hind III / Not I pour être testées dans les différents systèmes d'évaluation *in vitro*.

15 En ce qui concerne le gène codant pour la HSV1-TK sauvage et celle du mutant 2-865:H12, des constructions qui ont été réalisées avec le plasmide pXL2990. Ce vecteur, dérivé de pBSK (Stratagene) comporte le promoteur/enhanceur du CMV amplifié par PCR à partir du plasmide pGCN (Tanaka et coll. 1990 Cell 60 p375). Le gène HSV1-TK a été amplifié par PCR à l'aide du plasmide pBTK1 (voir exemple 20 1.1) en créant les sites NcoI et AvrII aux codons ATG et TGA respectivement. Ce gène a alors été cloné en aval du promoteur CMV du pXL2990 et en amont de la séquence de polyadénylation tardive de SV40 (amplifiée par PCR à l'aide du plasmide pGL3basic (Promega)) pour générer le plasmide pXL3022. De façon comparable le gène HSV1-TK issu du mutant 2-865:H12 a été amplifié par PCR à l'aide du 25 plasmide pXL2843 (voir exemple 3.4) puis cloné en aval du promoteur CMV du pXL2990 et en amont de la séquence de polyadénylation tardive de SV40 pour générer le plasmide pXL3037, voir Figure 4.

5.2 - Construction de vecteurs viraux

Selon un mode particulier, l'invention réside dans la construction et l'utilisation de vecteurs viraux permettant le transfert et l'expression in vivo des acides nucléiques tels que définis ci-avant.

5 S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le
10 cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans
15 le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et un acide nucléique selon l'invention. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non
20 fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions
25 peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont

insérés la région E4 et la séquence d'acides nucléiques de l'invention (Cf FR94 13355). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés
5 par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'acides nucléiques revendiquée. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée
10 cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol.
15 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon
20 les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Plus particulièrement, les constructions adénovirales selon l'invention sont obtenues conformément au protocole suivant :

Ils ont été construits selon la technologie décrite dans le brevet WO96/25506 auquel on se référera pour la description détaillée des plasmides ci-après cités. Pour
25 cela, le plasmide navette pACK3 a été utilisé, il dérive de ColE1 et contient i) le gène qui confère la résistance à la kanamycine, ii) le gène sacB de B. subtilis, iii) les séquences ITR-Psi (position 1-386 de l'adénovirus Ad5) séparées des séquences contenant le gène codant pour la protéine PIX (position 3447-4415 de l'adénovirus

Ad5) par les sites de restrictions EcoRV et SalI. Les cassettes d'expression eucaryotes des plasmides pXL3022 et pXL3037 ont été clonés entre les sites EcoRV et SalI du plasmide navette pACK3 pour former les plasmides pXL3050 et 3051 respectivement, voir figure 4. Par double recombinaison homologue à l'aide du
5 plasmide adénoviral pXL2822 (décrit par J. Crouzet et coll. 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. 94 sous presse), les plasmides adénoviraux pXL3075 et 3076 respectivement ont été générés. Ces plasmides ont été digérés par PacI et transfectés dans la lignée cellulaire humaine 293 afin de produire les virus ADV3075 et ADV3076. Ces virus sont délétés dans les régions E1 et E3 et qui contiennent respectivement les cassettes
10 d'expression des gènes HSV1-TK de l'enzyme sauvage et du mutant 2-865:H12.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de
15 cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du
20 génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsulation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et
25 in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt.

Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans une lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant une séquence d'acides nucléiques de l'invention d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un
5 plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Une lignée cellulaire utilisable est par exemple la lignée 293. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et
10 al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois
15 régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV
20 ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention comportant une séquence d'acides nucléiques selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence d'acides nucléiques est construit,
25 puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la
30 lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants

peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsulation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

- 5 Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes suicides dans les cellules tumorales.

5.3 - Vecteurs chimiques

- 10 Parmi les vecteurs synthétiques développés, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)_n, (LKKL)_n, polyéthylène imine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines
- 15 (lipofectamine, transfectam, etc) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire. En outre, le concept de la transfection ciblée a été développé, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère
- 20 cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit. La préparation d'une composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple
- 25 mise en contact des différents composants.

LISTE DE SEQUENCES

- 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:
- (i) DEPOSANT:
- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron
- (C) VILLE: ANTONY
- 10 (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165
- (G) TELEPHONE: 40.91.69.22
- (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96
- 15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVEAUX VARIANTS DE LA THYMIDINE KINASE, SEQUENCES D'ACIDES NUCLEIQUES CORRESPONDANTES ET LEUR UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE
- 20 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8
- (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- 25 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:
- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 8 acides aminés
- (B) TYPE: acides aminés
- (D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE:peptide
- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (D) AUTRE INFORMATION: Les quatres premiers Xaa
- 40 représentent un acide aminé quelconque et le troisième Xaa une thréonine ou une sérine.
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID NO: 1:
- 45 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Lys Xaa
- 5
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:
- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 8 acides aminés
- (B) TYPE: acides aminés
- (D) CONFIGURATION: linéaire
- 55 (ii) TYPE DE MOLECULE:peptide
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Gly Pro His Gly Met Gly Lys Thr

5

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10

(A) LONGUEUR: 1131 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

20	ATG GCT TCG TAC CCC GGC CAT CAA CAC GCG TCT GCG TTC GAC CAG GCT Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala 1 5 10 15	48
25	GCG CGT TCT CGC GGC CAT AGC AAC CGA CGT ACG GCG TTG CGC CCT CGC Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg 20 25 30	96
30	CGG CAG CAA GAA GCC ACG GAA GTC CGC CCG GAG CAG AAA ATG CCC ACG Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr 35 40 45	144
35	CTA CTG CGG GTT TAT ATA GAC GGT CCC CAC GGG ATA GGG AAA ACC ACC Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Ile Gly Lys Thr Thr 50 55 60	192
40	ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC CTG GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr 65 70 75 80	240
45	GTA CCC GAG CCG ATG ACT TAC TGG CGG GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr 85 90 95	288
50	ATC GCG AAC ATC TAC ACC ACA CAA CAC CGC CTC GAC CAG GGT GAG ATA Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile 100 105 110	336
55	TCG GCC GGG GAC GCG GCG GTG GTA ATG ACA AGC GCC CAG ATA ACA ATG Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met 115 120 125	384
60	GGC ATG CCT TAT GCC GTG ACC GAC GCC GTT CTG GCT CCT CAT ATC GGG Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly 130 135 140	432
65	GGG GAG GCT GGG AGC TCA CAT GCC CCG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile 145 150 155 160	480
70	TTC GAC CGC CAT CC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG CGG Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg 165 170 175	528

5	TAC CTT ATG GGC AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG GCC Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala 180 185 190	576
10	CTC ATC CCG CCG ACC TTG CCC GGC ACC AAC ATC GTG CTT GGG GCC CTT Leu Ile Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu 195 200 205	624
15	CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CCC CTG GCC AAA CGC CAG CGC CCC GGC Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly 210 215 220	672
20	GAG CGG CTG GAC CTG GCT ATG CTG GCT GCG ATT CGC CGC GTT TAC GGG Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly 225 230 235 240	720
25	CTA CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG TGC GGC GGG TCG TGG CGG Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg 245 250 255	768
30	GAG GAC TGG GGA CAG CTT TCG GGG ACC GCC GTG CCG CCC CAG GGT GCC Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala 260 265 270	816
35	GAG CCC CAG AGC AAC GCG GGC CCA CGA CCC CAT ATC GGG GAC ACG TTA Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu 275 280 285	864
40	TTT ACC CTG TTT CGG GCC CCC GAG TTG CTG GCC CCC AAC GGC GAC CTG Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu 290 295 300	912
45	TAT AAC GTG TTT GCC TGG GCC TTG GAC GTC TTG GCC AAA CGC CTC CGT Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg 305 310 315 320	960
50	TCC ATG CAC GTC TTT ATC CTG GAT TAC GAC CAA TCG CCG GCC GGC TGC Ser Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys 325 330 335	1008
55	CGG GAC GCC CTG CTG CAA CTT ACC TCC GGG ATG GTC CAG ACC CAC GTC Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val 340 345 350	1056
60	ACC ACC CCC GGC TCC ATA CCG ACG ATA TGC GAC CTG GCG CGC ACG TTT Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe 355 360 365	1104
65	GCC CGG GAG ATG GGG GAG GCT AAC TGA Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn * 370 375	1131

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

60

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(11) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

5 TTATGAATTC ATATGGCTTC GTACCCCGGC 30

10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TTATTTCTAG AGGTCAAGA TGAGGGT 27

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1131 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

40	ATG GCT TCG TAC CCC AGC CAT CAA CAC GCG TCT GCG TTC GAC CAG GCT Met Ala Ser Tyr Pro Ser His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala 1 5 10 15	48
45	GCG CGT TCT CGC GGC CAT AGC AAC CGA CGT ACG GCG TTG CGC CCT CGC Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg 20 25 30	96
50	CGG CAG CAA GAA GCC ACG GAA GTC CGC CCG GAG CAG AAA ATG CCC ACG Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr 35 40 45	144
55	CTA CTG CGG GTT TAT ATA GAC GGT CCC CAC GGG ATA GGG AAA ACC ACC Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Ile Gly Lys Thr Thr 50 55 60	192
60	ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC CTG GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr 65 70 75 80	240
65	GTA CCC GAG CCG ATG ACT TAC TGG CGG GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr	288

42

	85					90					95						
5	ATC Ile	GCG Ala	AAC Asn	ATC Ile 100	TAC Tyr	ACC Thr	ACA Thr	CAA Gln	CAC His 105	CGC Arg	CTC Leu	GAC Asp	CAG Gln	GGT Gly 110	GAG Glu	ATA Ile	336
10	TCG Ser	GCC Ala	GGG Gly 115	GAC Asp	GCG Ala	GCG Ala	GTG Val	GTA Val 120	ATG Met	ACA Thr	AGC Ser	GCC Ala	CAG Gln 125	ATA Ile	ACA Thr	ATG Met	384
15	GGC Gly 130	ATG Met	CCT Pro	TAT Tyr	GCC Ala	GTG Val	ACC Thr 135	GAC Asp	GCC Ala	GTT Val	CTG Leu	GCT Ala 140	CCT Pro	CAT His	ATC Ile	GGG Gly	432
20	GGG Gly 145	GAG Glu	GCT Ala	GGG Gly	AGC Ser	TCA Ser 150	CAT His	GCC Ala	CCG Pro	CCC Pro	CCG Pro 155	GCC Ala	CTC Leu	ACC Thr	CTC Leu	ATC Ile 160	480
25	TTC Phe	GAC Asp	CGC Arg	CAT His 165	CCC Pro	ATC Ile	GCC Ala	GCC Ala	CTC Leu	CTG Leu 170	TGC Cys	TAC Tyr	CCG Pro	GCC Ala	GCG Ala 175	CGG Arg	528
30	TAC Tyr	CTT Leu	ATG Met	GGC Gly 180	AGC Ser	ATG Met	ACC Thr	CCC Pro	CAG Gln 185	GCC Ala	GTG Val	CTG Leu	GCG Ala	TTC Phe 190	GTG Val	GCC Ala	576
35	CTC Leu	ATC Ile	CCG Pro 195	CCG Pro	ACC Thr	TTG Leu	CCC Pro	GGC Gly 200	ACC Thr	AAC Asn	ATC Ile	GTG Val	CTT Leu 205	GGG Gly	GCC Ala	CTT Leu	624
40	CCG Pro 210	GAG Glu	GAC Asp	AGA Arg	CAC His	ATC Ile	GAC Asp 215	CGC Arg	CTG Leu	GCC Ala	AAA Lys	CGC Arg 220	CAG Gln	CGC Arg	CCC Pro	GGC Gly	672
45	GAG Glu 225	CGG Arg	CTG Leu	GAC Asp	CTG Leu	GCT Ala	ATG Met 230	CTG Leu	GCT Ala	GCG Ala	ATT Ile 235	CGC Arg	CGC Arg	GTT Val	TAC Tyr	GGG Gly 240	720
50	CTA Leu	CTT Leu	GCC Ala	AAT Asn 245	ACG Thr	GTG Val	CGG Arg	TAT Tyr	CTG Leu	CAG Gln 250	TGC Cys	GGC Gly	GGG Gly	TCG Ser	TGG Trp 255	CGG Arg	768
55	GAG Glu 260	GAC Asp	TGG Trp	GGA Gly 260	CAG Gln	CTT Leu	TCG Ser	GGG Gly	ACG Thr 265	GCC Ala	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	CAG Gln 270	GGT Gly	GCC Ala	816
60	GAG Glu 275	CCC Pro	CAG Gln 275	AGC Ser	AAC Asn	GCG Ala	GGC Gly	CCA Pro 280	CGA Arg	CCC Pro	CAT His	ATC Ile	GGG Gly 285	GAC Asp	ACG Thr	TTA Leu	864
65	TTT Phe 290	ACC Thr	CTG Leu	TTT Phe	CGG Arg	GCC Ala	CCC Pro 295	GAG Glu	TTG Leu	CTG Leu	GCC Ala	CCC Pro 300	AAC Asn	GGC Gly	GAC Asp	CTG Leu	912
70	TAT Tyr 305	AAC Asn	GTG Val	TTT Phe	GCC Ala	TGG Trp 310	GCC Ala	TTG Leu	GAC Asp	GTC Val	TTG Leu 315	GCC Ala	AAA Lys	CGC Arg	CTC Leu	CGT Arg 320	960
75	TCC Ser	ATG Met	CAC His	GTC Val	TTT Phe 325	ATC Ile	CTG Leu	GAT Asp	TAC Tyr	GAC Asp 330	CAA Gln	TCG Ser	CCC Pro	GCC Ala	GGC Gly 335	TGC Cys	1008
80	CGG Arg	GAC Asp	GCC Ala	CTG Leu 340	CTG Leu	CAA Gln	CTT Leu	ACC Thr	TCC Ser 345	GGG Gly	ATG Met	GTC Val	CAG Gln	ACC Thr 350	CAC His	GTC Val	1056
85	ACC Ala	ACC Ala	CCC Ala	GGC Gly	TCC Ala	ATA Ile	CCG Ala	ACG Ala	ATA Ile	TGC Ala	GAC Ala	CTG Ala	GCG Ala	CGC Ala	ACG Ala	TTT Ala	1104

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
 355 360 365

5 GCC CGG GAG ATG GGG GAG GCT AAC TGA 1131
 Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn *
 370 375

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1131 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATG GCT TCG TAC CCC GGC CAT CAA CAC ACA TCT GCG TTC GAC CAG GCT 48
 Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Thr Ser Ala Phe Asp Gln Ala
 1 5 10 15

25 GCG CGT TCT CGC GGC CAT AGC AAC CGA CGT ACG GCG TTG CGC CCT CGC 96
 Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg
 20 25 30

30 CGG CAG CAA GAA GCC ACG GAA GTC CGC CCG GAG CAG AAA ATG CCC ACG 144
 Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr
 35 40 45

35 CTA CTG CGG GTT TAT ATA GAC GGT CCC CAC GGG ATA GGG AAA ACC ACC 192
 Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Ile Gly Lys Thr Thr
 50 55 60

40 ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC CTG GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC 240
 Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr
 65 70 75 80

45 GTA CCC GAG CCG ATG ACT TAC TGG CGG GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA 288
 Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr
 85 90 95

50 ATC GCG AAC ATC TAC ACC ACA CAA CAC CGC CTC GAC CAG GGT GAG ATA 336
 Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile
 100 105 110

55 TCG GCC GGG GAC GCG GCG GTG GTA ATG ACA AGC GCC CAG ATA ACA ATG 384
 Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met
 115 120 125

60 GGC ATG CCT TAT GCC GTG ACC GAC GCC GTT CTG GCT CCT CAT ATC GGG 432
 Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly
 130 135 140

GGG GAG GCT GGG AGC TCA CAT GCC CCG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC 480
 Gly Glu Ala Gly Ser Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile
 145 150 155 160

TTC GAC CGC CAT CCC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG CGC 528
 Phe Asp Arg His Pro Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg
 165 170 175

5	TAC CTT ATG GGC AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG GCC Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala 180 185 190	576
10	CTC ATC CCG CCG ACC TTG CCC GGC ACC AAC ATC GTG CTT GGG GCC CTT Leu Ile Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu 195 200 205	624
15	CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CGC CTG GCC AAA CGC CAG CGC CCC GGC Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly 210 215 220	672
20	GAG CGG CTG GAC CTG GCT ATG CTG GCT GCG ATT CGC CGC GTT TAC GGG Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly 225 230 235	720
25	CTA CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG TGC GGC GGG TCG TGG CGG Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg 245 250 255	768
30	GAG GAC TGG GGA CAG CTT TCG GGG ACG GCC GTG CCG CCC CAG GGT GCC Glu Asp Trp Gly Gln Leu Ser Gly Thr Ala Val Pro Pro Gln Gly Ala 260 265 270	816
35	GAG CCC CAG AGC AAC GCG GGC CCA CGA CCC CAT ATC GGG GAC ACG TTA Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu 275 280 285	864
40	TTT ACC CTG TTT CGG GCC CCC GAG TTG CTG GCC CCC AAC GGC GAC CTG Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu 290 295 300	912
45	TAT AAC GTG TTT GCC TGG GCC TTG GAC GTC TTG GCC AAA CGC CTC CGT Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg 305 310 315 320	960
50	TCC ATG CAC GTC TTT ATC CTG GAT TAC GAC CAA TCG CCC GCC GGC TGC Ser Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys 325 330 335	1008
55	CGG GAC GCC CTG CTG CAA CTT ACC TCC GGG ATG GTC CAG ACC CAC GTC Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val 340 345 350	1056
60	ACC ACC CCC GGC TCC ATA CCG ACG ATA TGC GAC CTG GCG CGC ACG TTT Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe 355 360 365	1104
65	GCC CGG GAG ATG GGG GAG GCT AAC TGA Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn * 370 375	1131

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

60

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1131 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

65

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

5	ATG GCT TCG TAC CCC GGC CAT CAA CAC ACA TCT GCG TTC GAC CAG GCT	48
	Met Ala Ser Tyr Pro Gly His Gln His Thr Ser Ala Phe Asp Gln Ala	
	1 5 10 15	
10	GCG CGT TCT CGC GGC CAT AGC AAC CGA CGT ACG GCG TTG CGC CCT CGC	96
	Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg	
	20 25 30	
15	CGG CAG CAA GAA GCC ACG GAA GTC CGC CCG GAG CAG AAA ATG CCC ACG	144
	Arg Gln Gln Glu Ala Thr Glu Val Arg Pro Glu Gln Lys Met Pro Thr	
	35 40 45	
20	CTA CTG CGG GTT TAT ATA GAC GGT CCC CAC GGG ATA GGG AAA ACC ACC	192
	Leu Leu Arg Val Tyr Ile Asp Gly Pro His Gly Ile Gly Lys Thr Thr	
	50 55 60	
25	ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC CTG GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC	240
	Thr Thr Gln Leu Leu Val Ala Leu Gly Ser Arg Asp Asp Ile Val Tyr	
	65 70 75 80	
30	GTA CCC GAG CCG ATG ACT TAC TGG CGG GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA	288
	Val Pro Glu Pro Met Thr Tyr Trp Arg Val Leu Gly Ala Ser Glu Thr	
	85 90 95	
35	ATC GCG AAC ATC TAC ACC ACA CAA CAC CGC CTC GAC CAG GGT GAG ATA	336
	Ile Ala Asn Ile Tyr Thr Thr Gln His Arg Leu Asp Gln Gly Glu Ile	
	100 105 110	
40	TCG GCC GGG GAC GCG GCG GTG GTA ATG ACA AGC GCC CAG ATA ACA ATG	384
	Ser Ala Gly Asp Ala Ala Val Val Met Thr Ser Ala Gln Ile Thr Met	
	115 120 125	
45	GGC ATG CCT TAT GCC GTG ACC GAC GCC GTT CTG GCT CCT CAT ATC GGG	432
	Gly Met Pro Tyr Ala Val Thr Asp Ala Val Leu Ala Pro His Ile Gly	
	130 135 140	
50	GGG GAG GCT GGG AGC TCA CAT GCC CCG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC	480
	Gly Glu Ala Gly Ser His Ala Pro Pro Pro Ala Leu Thr Leu Ile	
	145 150 155 160	
55	TTC GAC CGC CAT CCC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG CGG	528
	Phe Asp Arg His Ile Ala Ala Leu Leu Cys Tyr Pro Ala Ala Arg	
	165 170 175	
60	TAC CTT ATG GGC AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG GCC	576
	Tyr Leu Met Gly Ser Met Thr Pro Gln Ala Val Leu Ala Phe Val Ala	
	180 185 190	
65	CTC ATC CCG CCG ACT TTG CCC GGC ACC AAC ATC GTG CTT GGG GCC CTT	624
	Leu Ile Pro Pro Thr Leu Pro Gly Thr Asn Ile Val Leu Gly Ala Leu	
	195 200 205	
70	CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CGC CTG GCC AAA CGC CAG CGC CCC GGC	672
	Pro Glu Asp Arg His Ile Asp Arg Leu Ala Lys Arg Gln Arg Pro Gly	
	210 215 220	
75	GAG CGG CTG GAC CTG GCT ATG CTG GCT GCG ATT CGC CGC GTT TAC GGG	720
	Glu Arg Leu Asp Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Arg Arg Val Tyr Gly	
	225 230 235 240	
80	CTA CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG TGC GGC GGC TCG TGG CGG	768
	Leu Leu Ala Asn Thr Val Arg Tyr Leu Gln Cys Gly Gly Ser Trp Arg	

46

	245							250					255					
5	GAG Glu	GAC Asp	TGG Trp	GGA Gly 260	CAG Gln	CTT Leu	TCG Ser	GGG Gly 265	ACG Thr	GCC Ala	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	CAG Gln 270	GGT Gly	GCC Ala	816	
10	GAG Glu	CCC Pro	CAG Gln 275	AGC Ser	AAC Asn	GCG Ala	GGC Gly 280	CCA Pro	CGA Arg	CCC Pro	CAT His	ATC Ile	GGG Gly 285	GAC Asp	ACG Thr	TTA Leu	864	
15	TTT Phe 290	ACC Thr	CTG Leu	TTT Phe	CGG Arg	GCC Ala	CCC Pro 295	GAG Glu	TTG Leu	TTG Leu	GCC Ala	CCC Pro 300	AAC Asn	GGC Gly	GAC Asp	CTG Leu	912	
20	TAT Tyr 305	AAC Asn	GTG Val	TTT Phe	GCC Ala 310	TGG Trp	GCC Ala	TTG Leu	GAC Asp	GTC Val	TTG Leu 315	GCC Ala	AAA Lys	CGC Arg	CTC Leu	CGT Arg 320	960	
25	TCC Ser	ATG Met	CAC His	GTC Val 325	TTT Phe	ATC Ile	CTG Leu	GAT Asp	TAC Tyr	GAC Asp 330	CAA Gln	TCG Ser	CCC Pro	GCC Ala	GGC Gly 335	TGC Cys	1008	
30	CAA Gln	GAC Asp	GCC Ala	CTG Leu 340	CTG Leu	CAA Gln	CTT Leu	ACC Thr	TCC Ser 345	GGG Gly	ATG Met	GTC Val	CAG Gln	ACC Thr 350	CAC His	GTC Val	1056	
35	ACC Thr	ACC Thr	CCC Pro 355	GGC Gly	TCC Ser	ATA Ile	CCG Pro	ACG Thr 360	ATA Ile	TGC Cys	GAC Asp	CTG Leu	GCG Ala 365	CGC Arg	ACC Thr	TTT Phe	1104	
	GCC Ala 370	CGG Arg	GAG Glu	ATG Met	GGG Gly	GAG Glu	GCT Ala 375	AAC Asn	TGA *								1131	

REVENDICATIONS

1- Séquence d'acides nucléiques codant pour une thymidine kinase caractérisée en ce qu'elle possède par rapport à la séquence sauvage au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP associée à au moins une mutation dans la région N-terminale et/ou C-terminale.

2- Séquence d'acides nucléiques caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence codant pour une thymidine kinase sauvage, ladite séquence possédant au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP et au moins une mutation dans la région N-terminale et/ou C-terminale.

3- Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle dérive de la séquence codant pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1.

4- Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisée en ce ladite séquence comprend au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A).

5- Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 ou 4 caractérisée en ce ladite séquence comprend au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A) et au moins une substitution de la guanine en position 16 par une adénine (G16A).

6- Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 ou 4 caractérisée en ce ladite séquence comprend au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A) et au moins une double substitution des guanines en position 28 et 30 par des adénines (G28A et G30A).

7. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisée en ce que ladite séquence comprend en outre au moins une mutation dans sa région C-terminale.

8. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 4, 6 et 7 caractérisée en ce qu'elle possède au moins une substitution d'une guanine en position 180 par une adénine (G180A), au moins une double substitution des guanines en position 28 et 30 par des adénines (G28A et G30A) une double substitution des
5 cystosines en position 591 et 892 par des thymines (C591T et C892T) et une double substitution des guanines en position 1010 et 1011 par des adénines (G1010A et G1011A).

9. Séquence d'acides nucléiques codant pour un variant de la thymidine kinase caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi:

10 (a) la séquence SEQ ID n° 3 ou une partie de celle ci portant la mutation (G180A) ou un de leur brin complémentaire,

(b) les séquences SEQ ID n° 6 et SEQ ID n° 7 ou une partie de celles-ci portant la mutation (G180A) et respectivement la mutation G16A et la double mutation (G28A ; G30A) ou un de leur brin complémentaire,

15 (c) la séquence SEQ ID n° 8 ou une partie de celle-ci portant la mutation (G180A) la double mutation (G28A ; G30A), et la quadruple mutation (C591T; C892T; G1010A; G1011A) ou un de leur brin complémentaire

(d) toute séquence hybridant avec les séquences (a), (b) et/ou (c) et codant pour un variant de la thymidine kinase et telle que définie en revendication 1 ou 2.

20 (e) les variants de (a), (b), (c) et(d) résultant de la dégénérescence du code génétique.

10. Séquence d'acides nucléiques codant pour un variant d'une thymidine kinase sauvage susceptible d'être obtenue par mutagénèse, dirigée ou non, d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle peut être d'origine eucaryote, bactérienne, virale, synthétique ou semi-synthétique.
12. Variant d'une thymidine kinase sauvage susceptible d'être exprimé à partir
5 d'une séquence d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.
13. Variant d'une thymidine kinase comprenant au moins une mutation dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP associée à au moins une mutation dans sa région N-terminale et/ou C-terminale.
14. Variant selon la revendication 13 caractérisé en ce que la région impliquée
10 dans la région correspondant au site de fixation de l'ATP est représentée par le consensus GXXXXGK(T/S).
15. Variant selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit de préférence du motif GPHGMGKT.
16. Variant selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il comprend au
15 moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine.
17. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il s'agit du mutant 1537:E4.
18. Variant selon l'une des revendications 13 à 16 caractérisée en ce que la
20 mutation en région N-terminale est comprise dans les acides aminés 1 à 20 de ladite région.
19. Variant selon la revendication 18 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 1 à 15 de la région N-terminale.
20. Variant selon la revendication 19 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 1 à 10 de la région N-terminale.

21. Variant selon la revendication 20 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 5 à 10 de la région N-terminale.
22. Variant de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 comprenant au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine et une substitution en position 10 d'une Alanine par une Thréonine.
23. Variant de la thymidine kinase du virus herpès simplex de type 1 comprenant au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une Isoleucine et une substitution en position 6 d'une Glycine par une Sérine.
24. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il s'agit du mutant 2-865:H12.
25. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il s'agit du mutant 2-3361:D3.
26. Variant selon l'une des revendications 14 à 23 comprenant en outre au moins une mutation dans la région C-terminale.
27. Variant selon la revendication 26 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 320 à 350 de la région C-terminale.
28. Variant selon la revendication 27 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 325 à 345 de la région C-terminale.
29. Variant selon la revendication 28 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 330 à 343 de la région C-terminale.
30. Variant selon la revendication 29 caractérisée en ce que cette mutation est comprise dans les acides aminés 335 à 340 de la région C-terminale.
31. Variant de la thymidine kinase du virus herpès simplex de type 1 comprenant au moins une substitution en position 60 d'une Méthionine par une

Isoleucine, une substitution en position 10 d'une Alanine par une Thréonine et une substitution en position 337 d'une Arginine par une Glutamine.

32. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il s'agit du mutant 3-4216:H2.

5 33. Variant d'une thymidine kinase sauvage caractérisé en ce qu'il présente les propriétés cinétiques suivantes:

- une diminution substantielle voire totale d'inhibition de l'activité de phosphorylation du ganciclovir contrairement à l'enzyme sauvage pour laquelle l'inhibition est très nette à partir de 15 μ M;

10 -une augmentation d'au moins un facteur de 2 à 2,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20 μ M par rapport à l'enzyme sauvage et

- un rapport K_{cat}/K_m de la thymidine réduit d'un facteur 1 à 6 par rapport à celui de l'enzyme sauvage.

15 34- Variant d'une thymidine kinase selon les revendications 13 à 25 caractérisé en ce qu'il présente au moins l'une des performances cinétiques suivantes:

- une diminution significative de l'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à des concentrations élevées en ganciclovir ou en analogue de nucléoside;

20 - une vitesse de phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside au moins triplée et/ou

- un rapport K_{cat}/K_m soit inchangé soit de la thymidine réduit d'un facteur supérieur ou égal à 5 par rapport à celui de l'enzyme sauvage.

35. Variant d'une thymidine kinase selon les revendications 26 à 32 caractérisé en ce qu'il présente au moins l'une des performances cinétiques suivantes:

une absence l'inhibition de la phosphorylation du ganciclovir ou de l'analogue de nucléoside à des concentrations élevées en ganciclovir ou en analogue de nucléoside,

5 - une augmentation d'un facteur supérieur à 3,5 de la vitesse initiale de phosphorylation du GCV à partir de 15-20 μ M par rapport à l'enzyme sauvage.

- un rapport K_{cat}/K_m de la thymidine diminuée d'un facteur 4 par rapport à celui de l'enzyme sauvage.

10 36. Cassette d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 11, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription.

37- Vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 11 et ou une cassette selon la revendication 36.

38. Vecteur selon selon la revendication 37 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

15 39. Vecteur selon selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus recombinant défectif.

40. Vecteur selon selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un rétrovirus recombinant défectif.

20 41. Vecteur selon selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un AAV recombinant défectif.

42. Vecteur selon selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un HSV recombinant défectif.

43. Vecteur selon selon la revendication 37 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur chimique ou biochimique.

44. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, et/ou un vecteur selon l'une des revendications 37 à 43.

5 45. Composition pharmaceutique comprenant un variant selon l'une des revendications 12 à 35.

46. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 45 ou 46 pour le traitement des désordres hyperprolifératifs.

1/4

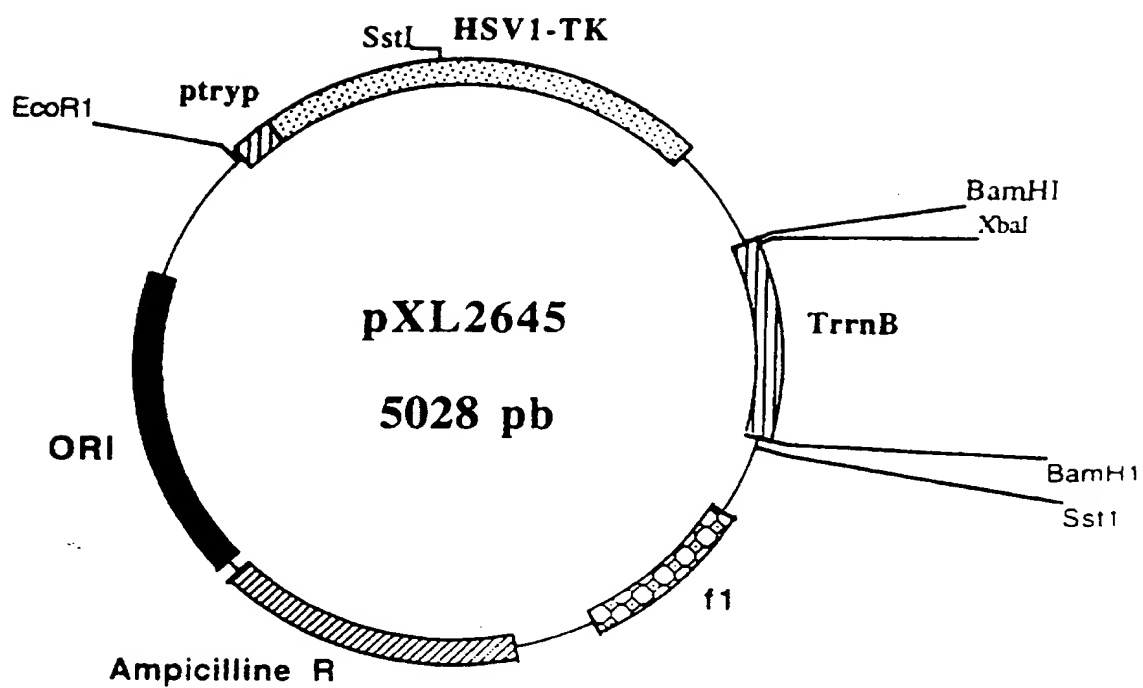


Figure 1

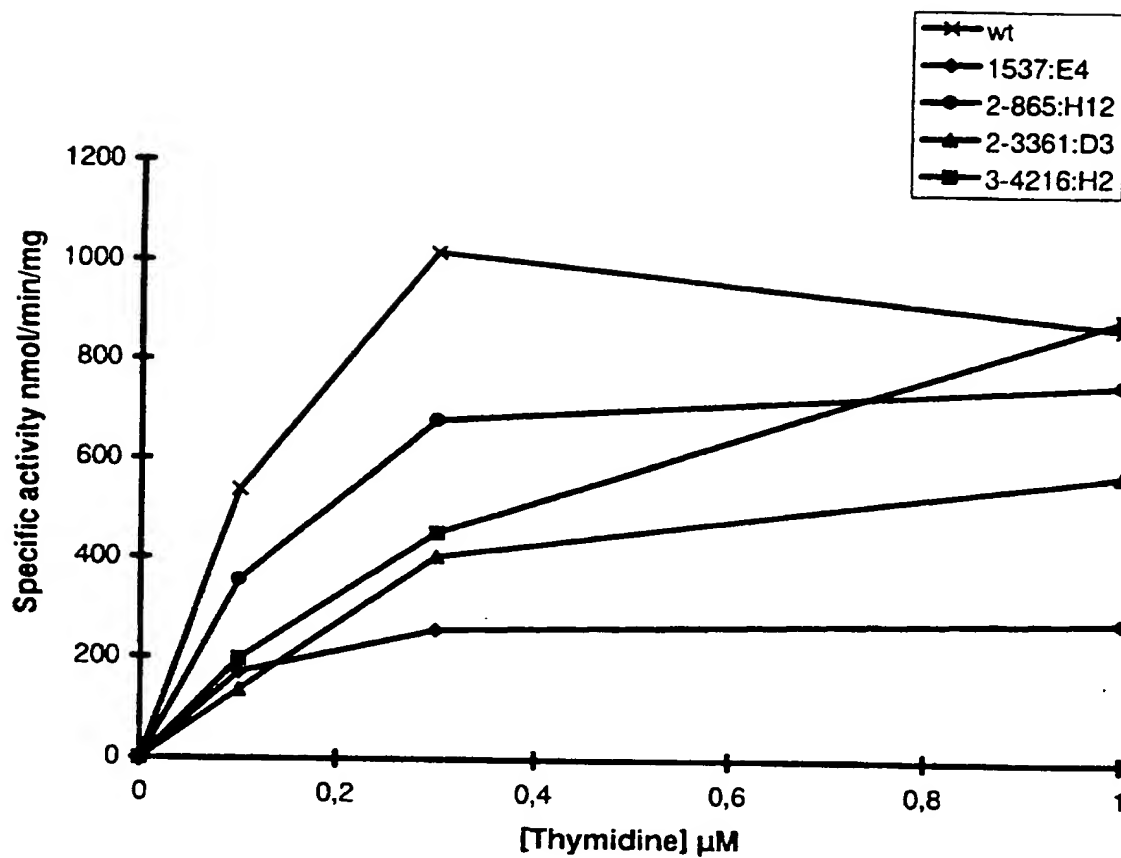


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/4

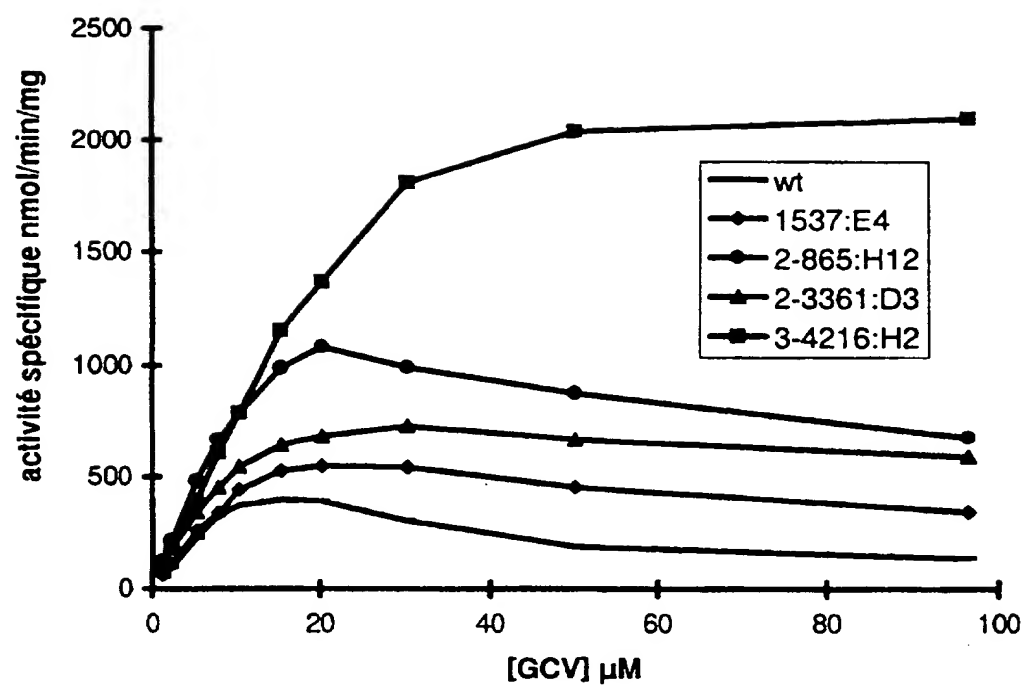


Figure 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

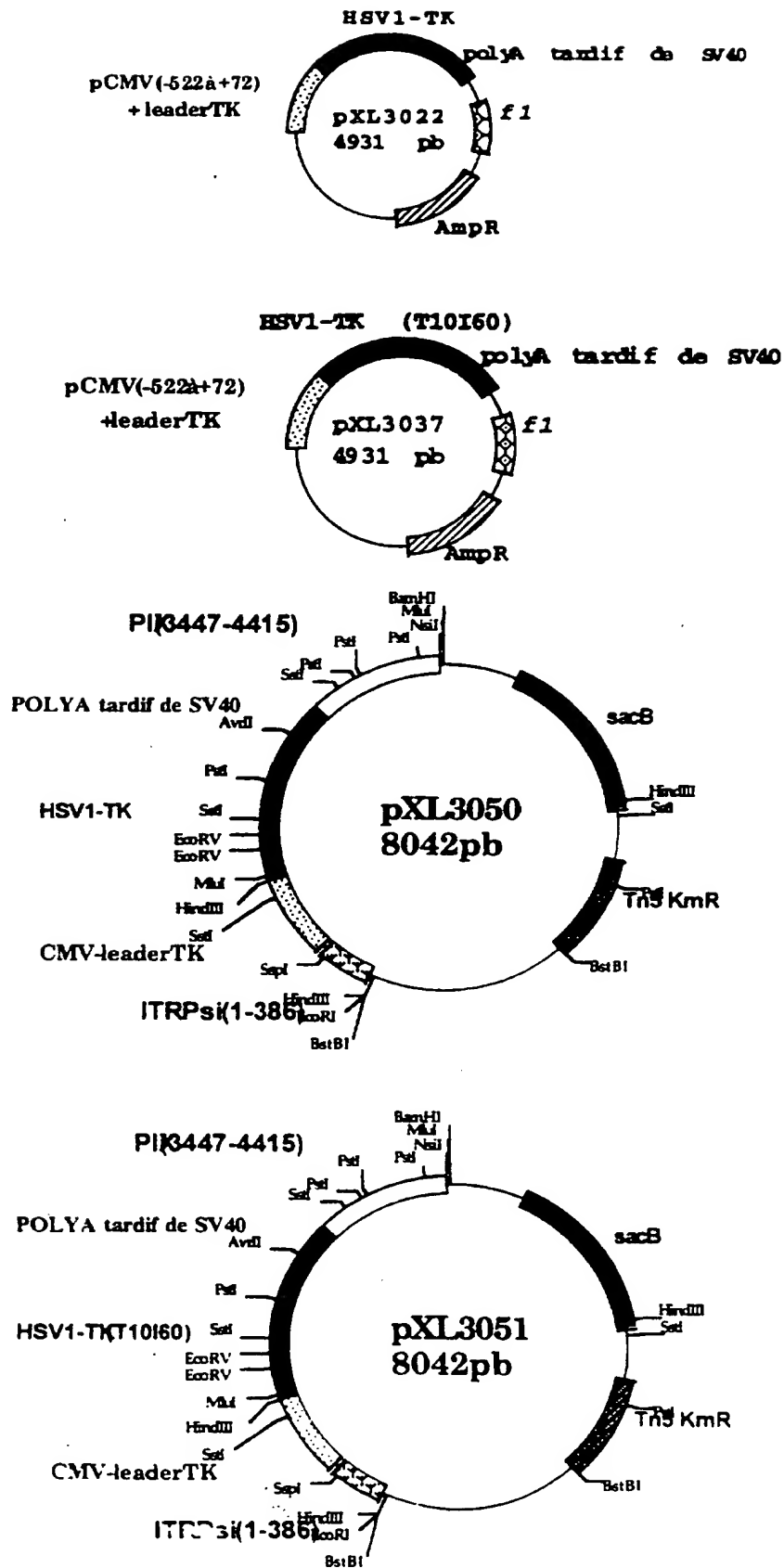


Figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/FR 97/00193

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/54 C12N9/12 A61K38/45

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 30007 A (UNIV WASHINGTON) 9 November 1995 see the whole document ---	1-3,7, 9-13,26, 27,33-46
Y	MOL CELL BIOL, OCT 1995, 15 (10) P5322-8, UNITED STATES, XP000196697 SALOMON B ET AL: "A truncated herpes simplex virus thymidine kinase phosphorylates thymidine and nucleoside analogs and does not cause sterility in transgenic mice." see the whole document --- -/-	1-3,7, 9-13,26, 27,33-46

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 1997

Date of mailing of the international search report

13. 05. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No
PCT/FR 97/00193

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, APR 26 1995, 209 (3) P966-73, UNITED STATES, XP000615235 MICHAEL M ET AL: "Site-directed mutagenesis of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase opposes the importance of amino acid positions 251, 321 and 348 for selective recognition of substrate analogs." see the whole document ---	1-3,7, 9-13,26, 27,33-46
A	PROC NATL ACAD SCI U S A, MAY 1 1993, 90 (9) P4012-6, UNITED STATES, XP002030293 MUNIR KM ET AL: "Thymidine kinase mutants obtained by random sequence selection." see the whole document ---	1-46
A	PROTEIN ENG, JAN 1994, 7 (1) P83-9, ENGLAND, XP002030294 MUNIR KM ET AL: "Herpes thymidine kinase mutants with altered catalytic efficiencies obtained by random sequence selection." see the whole document -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: d Application No

PCT/FR 97/00193

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9530007 A	09-11-95	AU 2434195 A	29-11-95
		CA 2189543 A	09-11-95
		EP 0758387 A	19-02-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 97/00193

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/54 C12N9/12 A61K38/45		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 95 30007 A (UNIV WASHINGTON) 9 Novembre 1995 voir le document en entier ---	1-3,7, 9-13,26, 27,33-46
Y	MOL CELL BIOL, OCT 1995, 15 (10) P5322-8, UNITED STATES, XP000196697 SALOMON B ET AL: "A truncated herpes simplex virus thymidine kinase phosphorylates thymidine and nucleoside analogs and does not cause sterility in transgenic mice." voir le document en entier --- -/--	1-3,7, 9-13,26, 27,33-46
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 28 Avril 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13. 05. 97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Gurdjian, D

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demo. Internationale No

PCT/FR 97/00193

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	n°. des revendications visées
Y	<p>BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, APR 26 1995, 209 (3) P966-73, UNITED STATES, XP000615235 MICHAEL M ET AL: "Site-directed mutagenesis of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase opposes the importance of amino acid positions 251, 321 and 348 for selective recognition of substrate analogs." voir le document en entier ---</p>	<p>1-3,7, 9-13,26, 27,33-46</p>
A	<p>PROC NATL ACAD SCI U S A, MAY 1 1993, 90 (9) P4012-6, UNITED STATES, XP002030293 MUNIR KM ET AL: "Thymidine kinase mutants obtained by random sequence selection." voir le document en entier ---</p>	<p>1-46</p>
A	<p>PROTEIN ENG, JAN 1994, 7 (1) P83-9, ENGLAND, XP002030294 MUNIR KM ET AL: "Herpes thymidine kinase mutants with altered catalytic efficiencies obtained by random sequence selection." voir le document en entier -----</p>	<p>1-46</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux ...mbres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 97/00193

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9530007 A	09-11-95	AU 2434195 A	29-11-95
		CA 2189543 A	09-11-95
		EP 0758387 A	19-02-97

This Page Blank (uspto)